



TITLE:

# 脳血管攣縮に関する実験的研究 : 赤血球溶血液中の血管収縮物質と, 脳血管収縮の作用機序

AUTHOR(S):

岡本, 新一郎

---

CITATION:

岡本, 新一郎. 脳血管攣縮に関する実験的研究 : 赤血球溶血液中の血管収縮物質と, 脳血管収縮の作用機序. 日本外科宝函 1982, 51(1): 93-103

ISSUE DATE:

1982-01-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/208917>

RIGHT:

脳血管攣縮に関する実験的研究  
——赤血球溶血液中の血管収縮物質と、  
脳血管収縮の作用機序——

京都大学脳神経外科学教室（主任：半田 肇教授）

岡 本 新 一 郎

〔原稿受付：昭和56年11月9日〕

Experimental Study of Cerebral Vasospasm  
—Biochemical Analysis of Vasoconstrictor in the Red  
Blood Cell Hemolysate and the Mechanism of Action—

SHINICHIRO OKAMOTO

Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School  
(Director: Prof. Dr. HAJIME HANDA)

Vasoconstrictor substance in ghost-free hemolysate of red blood cells which constricts the basilar arteries of cats in situ was biochemically analyzed. The substance was heat-labile and had a molecular weight of more than 20,000. By the Sephadex G-100 gel filtration, the substance was eluted in the same fractions as those including oxyhemoglobin. Both the hemolysate and purified hemoglobin constricted the basilar arteries in a concentration-dependent fashion. However, the maximal constriction induced by the latter was much less than that by the former.

Constrictions of isolated dog basilar arterial strips induced by hemolysate was significantly suppressed by the treatments of arteries with  $5 \times 10^{-5}$  M aspirin, an inhibitor of prostaglandin (PG) biosynthesis, or  $3 \times 10^{-5}$  g/ml polyphloretin phosphate, an antagonist of vasoconstrictor PG's. The PG-like substance released from dog pial arteries by the hemolysate action was estimated by bioassay using rat stomach strips.

It may be concluded that oxyhemoglobin has the most important role in the vasoconstrictor action of hemolysate and that the constriction of basilar arteries induced by hemolysate is mediated by the intrinsic vasoconstrictor PG's of the arterial wall.

---

Key words: Cerebral vasospasm, Hemoglobin, Prostaglandin, Red blood cell hemolysate, Subarachnoid hemorrhage.

索引語：脳血管攣縮，ヘモグロビン，プロスタグランジン，赤血球溶血液，クモ膜下出血。

Present Address: Dr. Shinichiro Okamoto, Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School, Kawaramachi, Shogoin, Sakyo-ku, 606 Kyoto, Japan.

## 緒 言

手術用顕微鏡下での microsurgery の導入により、脳動脈瘤の治療成績は格段の向上を見せた。しかし、破裂脳動脈瘤によるクモ膜下出血に伴う、いわゆる脳血管攣縮は、再出血と並んで、依然として予後を左右する重大な合併症であり、その発生機転や治療法は、未だに解明されていない。

脳血管攣縮は、臨床像として二つの大きな特徴を持っている。第一に、time-course の面から見ると、脳血管攣縮はクモ膜下出血直後には発生せず、出血後3～4日を経てから出現し(delayed)、いったん発生すると数日間から数週間持続し(prolonged)、また、永続的でなく、可逆性(reversible)である<sup>12)</sup>。第二に、脳血管攣縮の発生部位は、ほとんどの場合、動脈瘤の存在部位と、クモ膜下腔の凝血塊の量および部位に強く依存している<sup>6)</sup>。

脳血管攣縮の発生機転については、数多くの研究があり、中でも、上述のような臨床的特徴を説明できる機転として、クモ膜下血腫の融解に伴って放出される赤血球由来成分の役割が、近年注目されている<sup>10)</sup>。しかし、赤血球由来成分が、どのような機序によって脳動脈を収縮させるかは、ほとんど不明である。この点の解明は、直ちに脳血管攣縮の予防、治療に結びつき得ると考えられる。

本研究では、赤血球溶血液中の血管収縮物質を分析すると共に、その結果考えられる仮説に基いて、赤血球溶血液の血管作用における、脳動脈壁内因性 prostaglandin の役割について、実験的に検討した。

## 方 法

### 実験1 赤血球溶血液中の血管収縮物質の分析

実験は、芋坂<sup>19)</sup>の方法に従って、ネコ脳底動脈(in situ)を用いて行なった。体重3～4kgの雑種成猫に、pentobarbital 30 mg/kgの腹腔内投与による麻酔を施した。仰臥位にして手術台に固定した後、気管切開を施して、自発呼吸とした。気管、食道を右方に、左頸動脈を左方に圧排して、斜台前面に達し、付着した筋群を除去した後、斜台を大後頭孔から橋中央部付近まで開放した。眼科用水晶刀を用いて、オリンパス社製手術用顕微鏡下に硬膜およびクモ膜を切開して、脳底動脈を露出した。この時、硬膜血管の止血を充分に行ない、クモ膜下腔に血液が流入しないように細心の注意をはらった。わずかもクモ膜下腔に血液が流入し

た例は、実験から除外した。術野は生理的食塩水で満たし、平衡に達するまで、約1時間放置した。

術野は、手術用顕微鏡に取付けたオリンパス社製顕微鏡用カメラを用いてカラースライドフィルムに撮影し、後にスクリーン上に投影して、脳底動脈の外径を計測した。高濃度溶血液を投与した場合は、hemoglobinの色調のため、脳底動脈の透見が不可能となったので、試料を術野から吸引除去してから写真撮影を行なった。撮影は、種々の試料の局所投与前、投与後2分、5分、10分、30分に行ない、投与後の外径減少率を、投与前を100%として百分率で表わした。計測は数ヶ所で行ない、収縮が局所的に発生した場合は、最大収縮の見られた部位を選んで計測した。

各試料は、予め37°Cに保ち、0.5 mlを局所に投与して、観察終了後は生理的食塩水で数回洗浄し、安定するまで更に20～30分間放置した。

赤血球溶血試料は次のようにして調製した。ネコ股動脈より、約20 mlの動脈血をヘパリン加採血し、2,000 rpm、10分間の遠沈により、血漿およびbuffy coatを除去した後、得られた赤血球を5倍容の生食で3回洗浄した。洗浄赤血球に、ほぼ等容の蒸留水を加え、4°Cで一昼夜静置し、溶血させた。溶血液を、4°C、15,000 rpmで20分間遠沈し、ghost-freeの上清液を試料として用いた。

赤血球溶血液による脳底動脈の収縮の、濃度反応曲線を得るため、上述のようにして得た溶血液を蒸留水で希釈し、濃度系列を作った。濃度は、シアンメトヘモグロビン法によるhemoglobin濃度を指標とした。

赤血球溶血液中血管収縮物質の生化学的性状を知るため、次のような分析を行なった。まず、熱耐性を調べるため、100°C、10分間の熱処理を行なった。分子量の目安を知るために、東洋濾紙製membrane filter UP-20を用いて、限外濾過により分子量20,000以上の物質を除去した濾液について血管収縮能を調べた。更に、Sephadex G-100 column chromatographyによる、赤血球溶血液の分画を行なった。columnは、直径2.0 cm、高さ60 cmとし、pH 7.4の0.1 M phosphate bufferで安定化させ、溶出にも同じ液を用いた。2.0 mlずつの分画をつくり、日立製分光光度計により、波長280 nmの吸光度で、蛋白質量を測定した。これにより得られた蛋白質peakを示す各分画について、血管収縮能を調べた。

hemoglobinの精製は次のようにして行なった。まず、赤血球溶血液の硫酸アンモニウム塩析により、65

%飽和から75%飽和の間で沈殿する蛋白質を集め、pH 7.4 の0.1 M phosphate buffer に再溶解させ、上述の Sephadex G-100 column chromatography を行なった。更に、赤色に着色した hemoglobin を含む分画のうち、heme による吸光 (波長 410 nm) と蛋白部分による吸光 (波長 280 nm) の比が 3.5 と一定になる分画を選んで、精製 hemoglobin とした。

## 実験2 赤血球溶血液による血管収縮に対する拮抗剤の影響

実験は、イヌ摘出脳底動脈を用いて、in vitro で行なった。

体重 8~12 kg の雑種成犬に、thiopental sodium (RAVONAL) 50 mg/kg の腹腔内投与による麻酔を施し、総頸動脈からの放血により屠殺した。直ちに開頭して脳を摘出し、後述の栄養液中に浸した。脳底動脈を長さ約 15 mm にわたって剝離し、クモ膜を除去して、ラセン状条片標本を作成した。各標本は、両端をそれぞれ鉤針にかけて、20 ml の栄養液を入れた organ bath 中に垂直に懸垂し、下端は固定し、上端は strain gauge transducer (Toyo-Baldwin 社製) に接続した (図1)。organ bath 中の栄養液は 37°C に保ち、95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> の混合ガスを持続的に通気し、pH は 7.3 に保たれた。栄養液としては、modified Ringer-Locke 液を用い、その組成は、Na<sup>+</sup> 139.7, K<sup>+</sup> 5.4, Ca<sup>++</sup> 2.2, Mg<sup>++</sup> 1.0, Cl<sup>-</sup> 131.5, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 20.0, glucose 5.6

(mM) とした。血管条片には、resting tension として 1.5 g を負荷し、安定化のため 90~120 分間放置した。血管反応の測定は、試料の bath 内投与による血管条片の等尺性張力変化を、transducer を介して測定し、ペン書き oscillograph (三栄測器製) により記録した。1 回の測定後、栄養液で bath を 3 回洗浄し、更に 10 分毎に新しい栄養液と交換して 30~60 分後に次の測定を行なった。赤血球溶血液は、イヌの総頸動脈から、クエン酸ナトリウム 0.66 g を含む輪血用採血バッグに採血した約 200 ml の動脈血を用いて、前述と同様の方法で調製した。

赤血球溶血液は、原則として累積的に投与した。赤血球溶血液による収縮反応は、予め測定した 30 mM K<sup>+</sup> による脱分極性収縮反応を 100% として、収縮率を百分率で表わした。種々の拮抗物質の影響は、赤血球溶血液による反応を、拮抗物質の bath 内投与前後で測定し、比較することにより検討した。拮抗物質は、cinanserin, aspirin, polyphloretin phosphate (PPP), superoxide dismutase (SOD), catalase,  $\alpha$ -tocopherol を用いた。これらの拮抗物質は、原則として赤血球溶血液による反応測定の 20 分前に bath 内へ投与した。ただし、PPP は測定の 60 分前に投与した。

## 実験3 赤血球溶血液による脳動脈からの prostaglandin (PG) 様物質の遊離

実験は、Lane<sup>29)</sup>の方法に基づいて、superfusion technique を用いた bioassay により行なった。

脳動脈は、2 頭分のイヌ脳から、主幹動脈を含めた軟膜動脈を摘出し、前述の栄養液を入れ、混合ガスを通気した、約 1 ml の小さな bath 中に浸した。

assay organ としては、rat stomach strip (RSS) を用いた。成熟ラットを、pentobarbital 腹腔内大量投与により屠殺し、直ちに胃を摘出して、その底部を縦走方向に約 10 cm の条片標本とした。その一方を、日本光電製 isotonic transducer の bar に接続し、一方を固定して、2.5 g の tension ををかけて垂直に懸垂した。RSS の等張性収縮は、上記 transducer を介してペン書き oscillograph に記録した。栄養液は、stock 容器中で 37°C に保ち、95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 混合ガスを持続的に通気した。この栄養液を、ポンプによりまず脳動脈を入れた bath へ導き、これを通じた栄養液を assay 系に導いて、RSS を表面灌流させた。灌流速度は毎分 3.3 ml とした。RSS の PG に対する反応の選択性を高めるために、atropine 10<sup>-5</sup> M, chlorphenylamine 10<sup>-4</sup> M, cinanserin 10<sup>-4</sup> M, propranolol 10<sup>-4</sup> M, indomet-

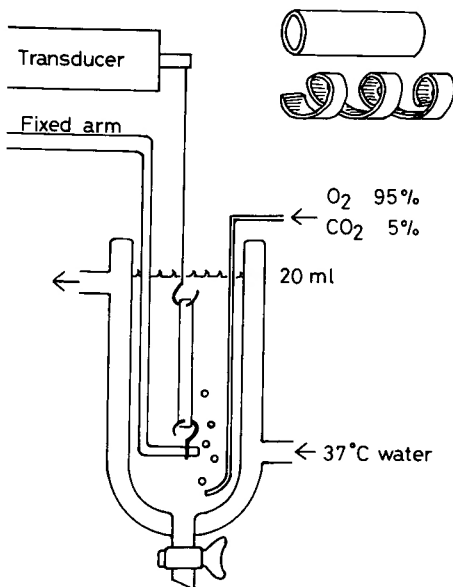


図1 摘出血管を用いた実験系の概略

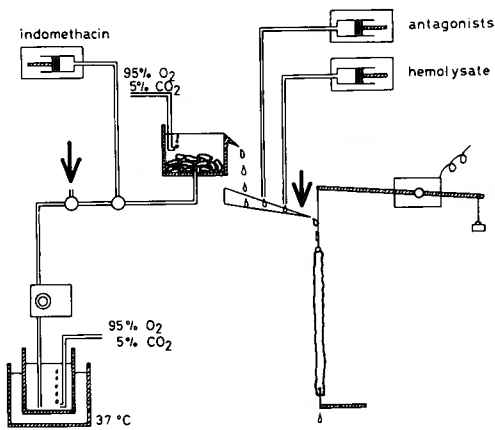


図2 superfusion による PG release 測定実験系の概略  
矢印は、摘出脳表動脈の上流、下流での赤血球溶血液投与位置を示す。

acin  $3 \times 10^{-5}$  M から成る拮抗薬混合液を、infusion pump を用いて毎分 0.033 ml の速度で、RSS にのみ表面灌流させた。RSS は、10 g/dl の hemoglobin を含む赤血球溶血液 40  $\mu$ l の bolus injection により、一過性の収縮反応を示したが、予め、最終濃度として 0.1 g/dl の hemoglobin を含む赤血球溶血液を栄養液と共に持続的に表面灌流しておく、tachyphylaxis のため、それ以後の bolus injection には、直接の反応は起らないか、又は、ごくわずかな反応に止まった。赤血球溶血液を表面灌流しても、RSS の PG に対する反応性は変化せず、従って assay organ としての機能に問題はなかった。以上の実験システムの概略を模式図として図2に示した。

赤血球溶血液による脳動脈からの PG 様物質の遊離を検討するため、10 g/dl の hemoglobin を含む赤血球溶血液 40  $\mu$ l を bolus に、まず脳動脈の下流 (図2の右矢印)、次に上流 (図2の左矢印) で灌流栄養液中に投与し、それぞれに対する RSS の反応を比較した。次いで、infusion pump で  $3 \times 10^{-5}$  M indomethacin を毎分 0.033 ml (最終濃度として  $3 \times 10^{-7}$  M) で30分間、脳動脈の上流から逆流栄養液中に投与し、同様の操作をくり返した。release された PG 様物質は、authentic PG E<sub>2</sub> に対する RSS の反応を基準にして、equivalent PG E<sub>2</sub> dose として定量した。

結 果

実験1 赤血球溶血液中の血管収縮物質の分析

赤血球溶血液は、hemoglobin 濃度として  $10^{-4}$  g/dl

から 2.0 g/dl の間で、濃度依存的にネコ脳底動脈を収縮させた (図3)。赤血球溶血液の血管収縮能は、100°C、10分間の加熱によって著明に減少し、また、membrane filter を通して分子量 20,000 以上の高分子物質を除去することにより、著明に減少した (図4)。Sephadex G-100 column chromatography により、赤血球溶血液は、分子量の大きい順に peak 1~peak 3 の3つの蛋白質 peak に分画された (図5)。peak 2 は、hemoglobin により赤色に着色し、吸光スペクトルは、oxyhemoglobin に近似していた。各 peak の血管収縮能を調べると、peak 2 にのみ有意の収縮能が認められた (図5)。精製した oxyhemoglobin は、濃度依存的にネコ脳底動脈を収縮させたが、収縮の程度は、赤血球溶血液による収縮と比べて、はるかに小さかった (図3)。

実験2 赤血球溶血液による血管収縮に対する拮抗剤の影響

ネコにおける in vivo の実験と同様に、イヌ赤血球溶血液は、in vitro で摘出イヌ脳底動脈を濃度依存的に収縮させた (図6)。

赤血球溶血液による脳底動脈の収縮は、PG 生合成

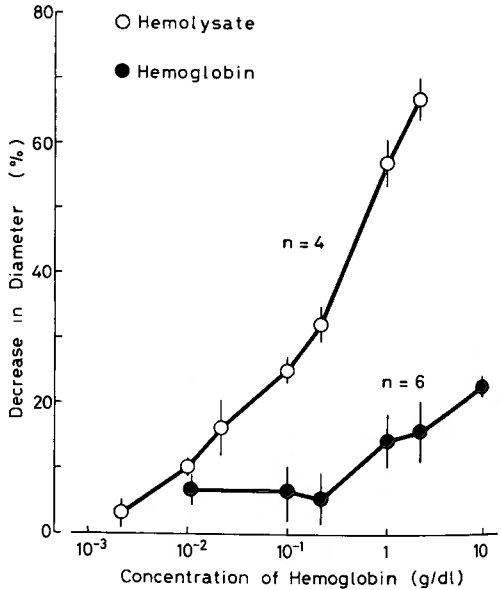


図3 赤血球溶血液および hemoglobin によるネコ脳底動脈の濃度収縮曲線

赤血球溶血液および hemoglobin は、濃度依存的にネコ脳底動脈を収縮させるが、hemoglobin による収縮は、赤血球溶血液による収縮よりも明らかに小さい。Mean  $\pm$  SEM.

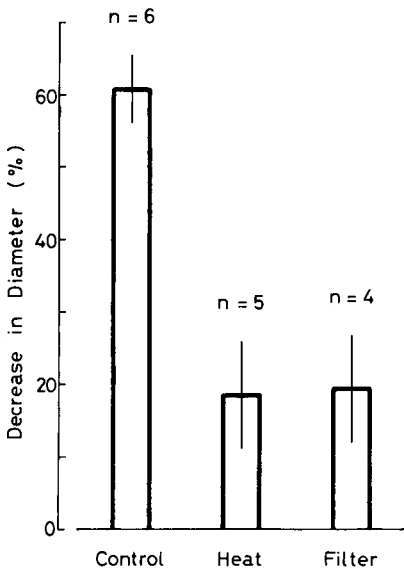


図4 赤血球溶血液の脳底動脈収縮能に対する、加熱および限外濾過の影響

赤血球溶血液の脳底動脈収縮能(左)は、100°C 10分間の加熱(中央)または membrane filter (UP-20)によって分子量20,000以上の物質を除去すること(右)によって、著明に減少する。Mean±SEM.

阻害剤 aspirin  $5 \times 10^{-5}$  M. または、PG 拮抗剤 PPP  $3 \times 10^{-5}$  g/ml の前処置により、著明に抑制された(図7). しかし、serotonin 拮抗剤 cinanserin  $10^{-6}$  M. または、free radical scavenger である SOD  $1.1 \times 10^3$  U/dl, catalase  $1.9 \times 10^4$  U/dl,  $\alpha$ -tocopherol  $10^{-4}$  M の前処置によっては抑制されなかった(表1).

赤血球溶血液の脳底動脈収縮作用における、赤血球由来の PG の関与を検討するため、溶血前の洗浄赤血球を  $10^{-3}$  M aspirin を含む生食で60分間 incubate し、更に  $10^{-3}$  M aspirin 溶液を用いて溶血させた. このようにして得た、aspirin 処理溶血液は、aspirin で処理しない対照溶血液と同程度の脳底動脈収縮作用を示した(表2).

### 実験3 赤血球溶血液による脳動脈からのPG様物質の遊離

脳動脈より下流で灌流栄養液中に投与した赤血球溶血液は、RSS の収縮を誘発しないか、又は、ごく小さな収縮反応を誘発するに止まった. しかし、脳動脈より上流で赤血球溶血液を投与すると、1~2分の delay をもって、RSS の強い収縮が誘発され、赤血球溶血液の作用によって、脳動脈から RSS 収縮物質が遊離されることが示された(図8). この収縮反応は、脳動脈

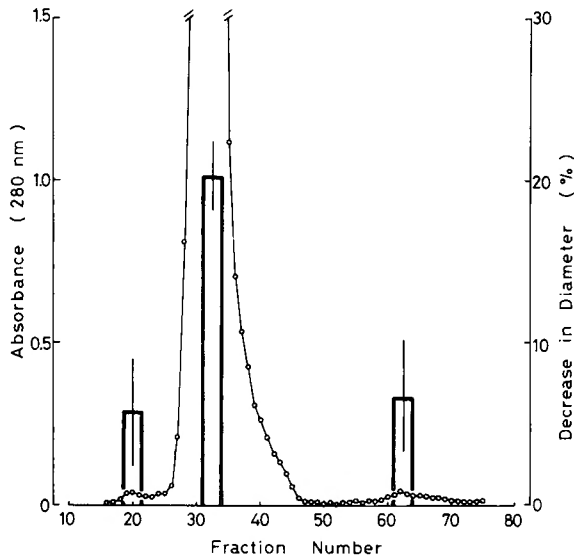


図5 赤血球溶血液の Sephadex G-100 column chromatography 流出パターンと、各蛋白質 peak の脳底動脈収縮能

280 nm 吸光度による蛋白質 peak は、分子量の大きい順に1~3の peak が得られ、脳底動脈収縮能は peak 2 で最大である。各 peak とも n=6. Mean±SEM.

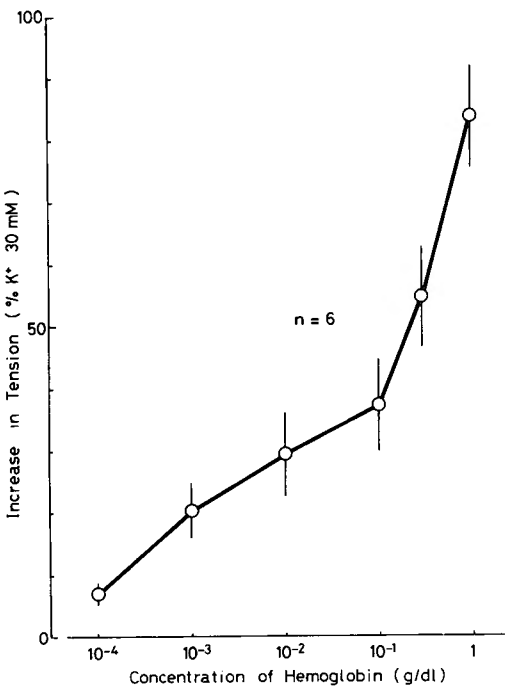


図6 赤血球溶血液による摘出イヌ脳底動脈の濃度収縮曲線  
赤血球溶血液は、摘出イヌ脳底動脈を濃度依存的に収縮させる。30 mM K<sup>+</sup> による収縮を100%とした。Mean±SEM.

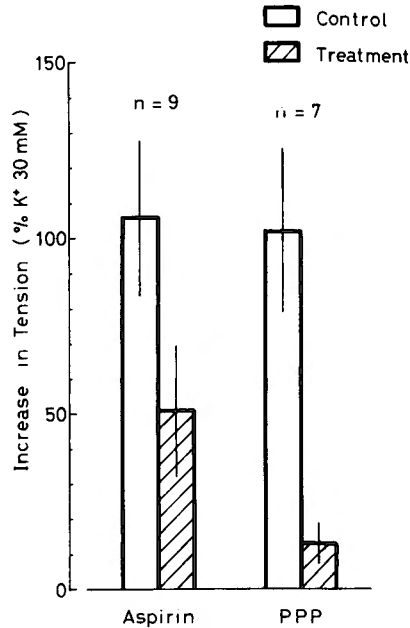


図7 赤血球溶血液による脳底動脈収縮に対する aspirin, PPP の影響  
赤血球溶血液 (1.0 g/dl hemoglobin) による脳底動脈収縮は、aspirin  $5 \times 10^{-5}$  M または、PPP  $3 \times 10^{-5}$  g/ml の処置により著明に抑制される。30 mM K<sup>+</sup> による収縮を100%とした。Mean ± SEM.

を  $3 \times 10^{-7}$  M indomethacin で30分間処理することにより、著明に抑制された (図8, 9)。authentic PG E<sub>2</sub> に対する RSS の収縮は、indomethacin の処置前後で

変化しないか、又は、処置後わずかな増強傾向が認められた。indomethacin 処置中止後、脳動脈を栄養液で約60分灌流すると、赤血球溶血液による PG 様物質

表1 赤血球溶血液による脳底動脈収縮に対する cinanserin, free radical scavenger の影響

		赤血球溶血液中の hemoglobin 濃度 (g/dl)				
		10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	1.0
cinanserin 10 <sup>-6</sup> M (n=6)	control	13.8±6.4	28.5±9.9	19.5±8.4	31.3±8.9	100
	treatment	9.9±3.3	14.0±4.5	14.4±6.5	41.3±5.7	92.9±5.0
SOD 1.1×10 <sup>3</sup> U/dl (n=5)	control	6.7±2.4	18.8±4.6	28.0±7.7	58.9±15.0	100
	treatment	4.8±1.3	11.6±3.2	17.9±5.7	58.0±13.2	101.7±3.9
catalase 1.9×10 <sup>4</sup> U/dl (n=5)	control	2.3±1.5	7.5±3.0	11.8±2.4	34.1±3.2	100
	treatment	2.5±1.4	8.6±2.8	11.3±3.1	40.6±9.5	95.9±5.8
α-tocopherol 10 <sup>-4</sup> M (n=6)	control	0.9±0.4	12.3±3.7	21.5±8.4	47.2±4.6	100
	treatment	1.4±0.7	8.4±2.4	20.0±3.0	48.1±6.4	96.9±5.0

control の最大収縮を100%とした。Mean±SEM.

表2 赤血球溶血液による脳底動脈収縮に対する赤血球 aspirin 処理の影響

	赤血球溶液中の hemoglobin 濃度 (g/dl)				
	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$10^{-1}$	1.0
aspirin 非処理赤血球 (n=5)	$3.8 \pm 2.3$	$15.7 \pm 3.8$	$22.7 \pm 5.0$	$47.9 \pm 9.4$	100
aspirin 処理赤血球 (n=5)	$4.3 \pm 1.6$	$16.4 \pm 4.7$	$21.3 \pm 7.8$	$53.1 \pm 8.2$	$91.0 \pm 7.1$

非処理群の最大収縮を100%とした。Mean  $\pm$  S.E.M.

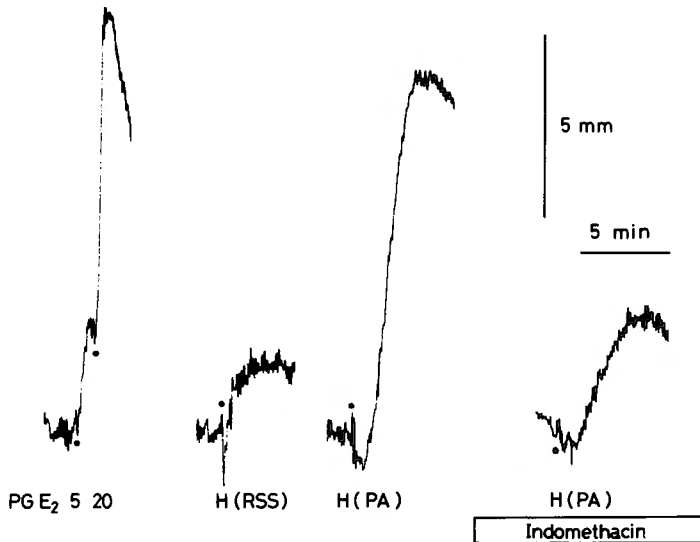


図8 superfusion 実験における RSS 収縮反応の1例.

RSS は authentic PG E<sub>2</sub> 5 および 20 p mol に対しよく反応する。赤血球溶血液 (10 g/dl hemoglobin, 40  $\mu$ l) を、脳血管の下流で投与 (H(RSS)) しても RSS はほとんど収縮しないが、上流で投与 (H(PA)) すると RSS の著明な収縮が起る。この反応は indomethacin  $3 \times 10^{-7}$  M による脳底動脈処理によって著明に抑制される。

の遊離能の回復が認められた (図9)。

## 考 察

### 1. 赤血球溶血液中の脳血管収縮物質

本研究の実験1および実験2により、赤血球溶血液中には、in situ のネコ脳底動脈、および摘出したイヌ脳底動脈を、濃度依存的に収縮させる物質が含まれていることが判明した。ネコ赤血球溶血液については、実験1での分析結果から、この物質は分子量20,000以上で、熱不耐性であり、Sephadex G-100 によるゲル濾過では、oxyhemoglobin と同一の蛋白質 peak に存在することが分った。これらの結果から、脳血管収縮物質としては、oxyhemoglobin と同一または非常に類似した蛋白質が中心的な役割を持っていると考えること

ができる。この結果は、イヌ血液混合孵置液中の脳血管収縮物質についての分析結果<sup>16)</sup>と一致している。イヌ赤血球溶血液中の血管収縮物質についての最近の分析によると、この物質は、分子量40,000~45,000の蛋白質である<sup>2)</sup>。しかし、この報告では、hemoglobin にはイヌ脳底動脈に対して収縮能がなかったとしており、著者の結果や、他の報告<sup>3,26)</sup>と明らかに異なっている。

一方、実験1の結果から、精製したネコ hemoglobin は、ネコ脳底動脈を濃度依存的に収縮させることが明らかになった。最近、ヒトの oxyhemoglobin が、摘出したイヌ脳底動脈を濃度依存的に収縮させることが報告された<sup>26)</sup>。これらの事実は、oxyhemoglobin は種差に関係なく脳血管収縮作用を有することを示唆している。しかし、本実験の結果では、精製 hemoglobin による



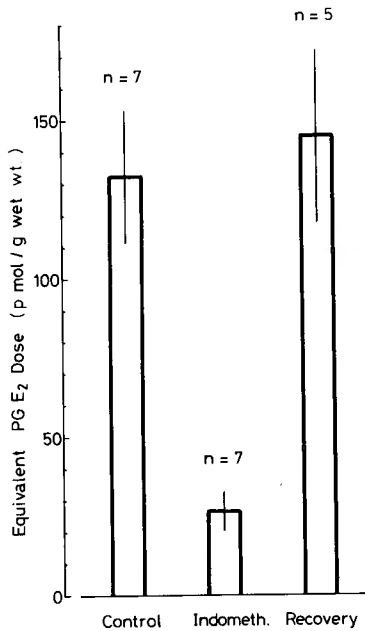


図9 赤血球溶血液による脳動脈からのPG様物質のrelease

湿重量1g当りの脳表動脈からreleaseされるPG様物質を、それと同程度のRSS収縮を起すPG F<sub>2α</sub>量(p mol)として表わした。Mean±SEM. 赤血球溶血液の刺激により、脳表動脈は、PG様物質をreleaseする(左および中央)。indomethacine処置を中止すると、再びreleaseが認められるようになる(右)。

脳底動脈の最大収縮は、赤血球溶血液による最大収縮より明らかに小さかった。hemoglobinは比較的安定な蛋白質であり、実験1で用いた精製操作により失活することは考え難い。従って、赤血球溶液中の血管収縮物質としては、oxyhemoglobinが中心的な役割を果しているが、oxyhemoglobin単独ではなく、他の溶血中物質との相互作用によって、より強力な血管収縮作用を示すという可能性も考えられる。

## 2. 赤血球溶血液の血管作用機序

hemoglobinは、arachidonic acidからprostaglandinを生成するcyclo-oxygenaseのco-factorとして働くといわれる<sup>32)</sup>。一方、PG F<sub>2α</sub>, E<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub> (Tx A<sub>2</sub>)などのcyclo-oxygenaseによるarachidonic acid代謝産物は、強力な脳血管収縮作用を持っている<sup>5,31)</sup>。著者は、この点に注目し、主として赤血球の脳底動脈収縮作用における、PG生成の関与について検討した。

実験2では、赤血球溶血液による摘出イヌ脳底動脈の収縮がaspirin又はPPPで脳底動脈を処理することにより、著明に抑制されることが明らかとなった。aspirinがcyclo-oxygenaseの阻害剤であることは広く知られている<sup>7)</sup>。又、PPPは、平滑筋に対する収縮性PGの選択的拮抗剤である<sup>4,27)</sup>。最近、血小板や白血球を含んだ全血の溶血液について、同様の報告がなされた<sup>28)</sup>。しかし、本実験では、他の報告<sup>19,22)</sup>と同様に、溶血前の洗浄赤血球には血管収縮能は認められず、溶血することにより初めて血管収縮能が出現した。従って、用いた赤血球溶血液には、血小板や白血球由来のPGその他の血管収縮物質の混入は考え難い。また、赤血球に対するaspirin処置によっても、溶血液の血管収縮能が変化しないことから、赤血球で合成されると思われるPGの作用も無視し得る。これらの事実は、赤血球溶血液による脳底動脈の収縮に、動脈壁でのPG生成が深く関与し、主として、合成された血管収縮性PGが脳底動脈の収縮を誘発していることを示している。

イヌの摘出上腸間膜動脈は、赤血球溶血液によって弛緩反応を示し、この反応は、 $2 \times 10^{-4}$  M aspirinによって抑制される<sup>18)</sup>。このことは、赤血球溶血液が、脳動脈に限らず、一般に血管壁でのPG生成促進作用を持っていることを示唆している。

一方、脳動脈が、赤血球溶血液の作用により、実際にPG様物質を遊離することは、実験3の結果から明らかである。実験3からは、いかなる種類のPGが遊離したかを直ちに同定することはできない。しかし、RSSはPG E<sub>2</sub>に最も感受性が高く、次いでPG F<sub>2α</sub>, I<sub>2</sub>, Tx A<sub>2</sub>にもわずかに反応するが、PG A<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>には反応しない<sup>30)</sup>。従って、脳底動脈収縮に関与するのは、PG E<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub>またはTx A<sub>2</sub>である可能性が強いと言える。脳動脈は、外因性arachidonic acidから実際にこれらの代謝産物を生成する能力を有している<sup>9)</sup>。

oxyhemoglobinは、autoxidationによって、methemoglobinに変わる際、活性酸素の一種であるsuperoxideを放出する<sup>15)</sup>。superoxideやhydrogen peroxide, hydroxyl radicalなどのfree radicalは、細胞膜の構成成分である不飽和脂肪酸の過酸化を惹き起し、一方、過酸化脂質には血管収縮能があるといわれる<sup>24)</sup>。従って、純粋なoxyhemoglobinの血管収縮作用に関しては、このようなfree radical reactionが関与していることも考えられる。しかし、赤血球中には、細胞にとって有害な活性酸素を直ちに除去する、いわゆる

free radical scavenger が豊富に存在している<sup>13)</sup>, scavenger としては, SOD, catalase, glutathione peroxidase などの酵素や,  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) などがある. 従って, 赤血球溶血液の血管作用においても発生する free radical は, 有効に scavenge されていることが考えられる. 実験 2 で, SOD, catalase,  $\alpha$ -tocopherol によって, 赤血球溶血液の血管収縮能が抑制されなかったことは, 少なくとも, 遊離した free radical が直接平滑筋細胞膜に作用しているのではないということを示している.

本研究の実験 2, 実験 3 からは, 赤血球溶血液がどのような機序で動脈壁での PG 合成, 遊離を促進させたかは明らかでない. hemoglobin が cyclo-oxygenase の co-factor として作用したことも考えられるが, 最近の oxyhemoglobin に関する知見から, oxyhemoglobin 自体が oxygenase 様作用により遊離不飽和脂肪酸の過酸化を起したという可能性も否定できない<sup>10)</sup>.

### 3. 脳血管攣縮の発生機序

脳血管攣縮の成因については, 機械的刺激, 交感神経の関与, クモ膜下腔内血液由来の血管収縮物質, 動脈壁の器質的変化などについて, 数多くの研究がなされている<sup>10)</sup>. 特に, Osaka<sup>19)</sup>は, 血液の各種分画の血管収縮能について詳細に検討し, 初めて赤血球由来物質の重要性を指摘した. クモ膜下腔に出血した血液は, 凝血となり, 出血後 12~32 時間ごろから, 赤血球の崩壊が始まり, 7 日目ごろに peak に達する<sup>20)</sup>. このようなクモ膜下腔内凝血の溶血過程は, 臨床例で見られる脳血管攣縮の時間的経過とよく一致する<sup>12)</sup>. 更に, この説は, 近年 CT より明らかにされた, クモ膜下血腫と脳血管攣縮発生頻度との強い相関についても, 充分な説明を与える<sup>6)</sup>. このように, 赤血球由来物質は, 脳血管攣縮の原因物質として重大な役割を持っていると考えられるにもかかわらず, 赤血球内容物についての血管収縮能に関する分析の報告は少なく, 結果も一定していない<sup>2,3)</sup>.

本研究の実験結果は, クモ膜下出血後の脳血管攣縮の発生において, 赤血球由来物質, 中でも特に oxyhemoglobin の重要性を明らかにすると共に, 赤血球溶血液の作用によって血管壁で合成される内因性 PG が, 重要な役割を担っていることを明らかにした.

prostaglandin, 特に PG E<sub>2</sub>, F<sub>2 $\alpha$</sub>  および T<sub>x</sub> A<sub>2</sub> などは, 強い脳動脈収縮作用をもつことから, 以前より脳血管攣縮の原因物質としての可能性を指摘されてき

た<sup>5,31)</sup>. ただ, 従来原因物質とされてきたのは, 血小板または脳組織由来の PG, すなわち, 脳動脈に対して外因性の PG であった. しかし, PG を含めて, 血小板由来の脳血管収縮物質は, 正常体温下での短時間の保存によりその収縮能が消失する<sup>19,22)</sup>. また, 凝血過程の血小板や, 損傷された脳実質から放出される PG は, 出血直後から脳動脈に作用すると考えられるから, 臨床例で見られるような, 出血から攣縮発生までの delay を説明することはできない. 従って, このような外因性 PG は, 脳血管攣縮の原因物質とは考え難い.

一方, 脳動脈には, 血管壁自体で内因性 PG を合成する能力がある<sup>23)</sup>. 脳動脈が, 外から与えた arachidonic acid や PG endoperoxide を利用して, また, 刺激に対して血管壁から生成される arachidonic acid を利用して, どのような種類の PG を生成するかについては, いまだ定説はない<sup>1,8,9,14)</sup>. 本研究のように, 赤血球溶血液の作用によって, 血管壁自体の arachidonic acid から, 脳動脈がどの種類の PG を生成するかという点は, 今後の最も興味ある課題である. 少なくとも, 実験 2 の条件下では, 脳底動脈は赤血球溶血液の作用により, 血管収縮性の PG を主として生成したと考えることができる. 脳動脈を含め, 血管壁で生成される内因性 PG のうち, 強力な血管拡張作用をもつ PG I<sub>2</sub> は, 主に内皮細胞で合成される<sup>17)</sup>. 脳血管攣縮によって死亡した患者の脳動脈や, 実験的クモ膜下出血を起した動物の脳動脈では, 組織学的な特徴として, 内膜損傷が指摘されている<sup>11,25)</sup>. このような動脈では, 内皮細胞での PG I<sub>2</sub> 産出能が低下ないし消失し, 結果として, 動脈壁全体としての内因性 PG は, 血管収縮性 PG に偏ることは充分予想される.

以上述べたことから, 著者は, クモ膜下出血患者に見られる脳血管攣縮の発生機序について, 次のように考える. クモ膜下出血の直後にクモ膜下腔の血液中の血小板から放出される, serotonin や PG は, 血小板凝集を促進し, 一過性に動脈を収縮させることにより, 止血を促進するように働くが, いわゆる脳血管攣縮は惹き起さない. これに対して, 出血から数日後, クモ膜下凝血の融解に伴って放出される, oxyhemoglobin を中心とした赤血球由来物質は, 脳動脈壁での内因性 PG, 特に血管収縮性 PG の合成, 遊離を促進し, 脳動脈に高度の収縮を惹起する. この際, 内膜損傷に伴う脳動脈の PG I<sub>2</sub> 産出能の低下も, 収縮増強の一因子と考えられる.

従って、今後、脳血管攣縮の予防、治療として、出血後早期の手術によるクモ膜下血腫の充分な除去<sup>21)</sup>と共に、PG合成阻害剤、および、PG拮抗剤の予防的投与が考慮されるべきであろう。

## 結 論

1. 赤血球溶血液中の血管収縮物質は、oxyhemoglobin または類似の蛋白質である。しかし、赤血球溶血液全体としての血管収縮作用には、oxyhemoglobin と他の何らかの物質との相互作用が関与している可能性がある。
2. 赤血球溶血液は、主として、血管壁での内因性PGの合成、遊離を促進することにより脳動脈を収縮させる。
3. クモ膜下出血後の脳血管攣縮の発生機序として、クモ膜下血腫の融解に伴って放出される赤血球由来物質によって、脳動脈壁での血管収縮性PGの生成、遊離が促進され、攣縮が発生するというメカニズムが考えられる。

稿を終えるにあたり、御校閲いただいた、半田 肇教授に深謝いたします。また、終始御指導、御鞭撻いただいた芦坂邦彦先生(現大阪医科大学脳神経外科助教授)、快く実験の場をお与えいただくと共に、御指導、御鞭撻いただいた、滋賀医科大学薬理学教室、戸田昇教授に深甚の謝意を表します。実験手技について御指導いただいた、京都大学付属病院中央検査部、村地 孝教授、滋賀医科大学薬理学教室、林 茂寛博士(現テキサス大学)には、衷心より感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Abdel-Halim MS, von Holst H, et al: Prostaglandin profiles in tissue and blood vessels from human brain. *J Neurochem* **34**: 1331-1333, 1980.
- 2) Cheung ST, McIlhenny MP, et al: Preliminary characterization of vasocontractile activities in erythrocytes. *J Neurosurg* **53**: 37-43, 1980.
- 3) 長久雅博: 脳血管攣縮の実験的研究—とくに血色素成分の攣縮作用について。大阪医学学会雑誌 **24**: 211-223, 1975.
- 4) Eakins K: Prostaglandin antagonism by polymeric phosphates of phloretin and related compounds. *Ann N Y Acad Sci* **180**: 386-395, 1971.
- 5) Ellis EF, Nies AS, et al: Cerebral arterial smooth muscle contraction by thromboxane A<sub>2</sub>. *Stroke* **8**: 480-483, 1977.
- 6) Fisher CM, Kistler JP, et al: Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery* **6**: 1-9, 1980.
- 7) Flower RJ: Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis. *Pharmacol Rev* **26**: 33-67, 1974.
- 8) Gerritsen ME, Parks TP, et al: Prostaglandin endoperoxide metabolism by bovine cerebral microvessels. *Biochim Biophys Acta* **619**: 196-206, 1980.
- 9) Hagen AA, White RP, et al: Synthesis of prostaglandins and thromboxane B<sub>2</sub> by cerebral arteries. *Stroke* **10**: 306-309, 1979.
- 10) 半田 肇, 岡本新一郎: 血管攣縮の発生機転. 脳血管. 臨床科学 **17**: 61-66, 1981.
- 11) Hughes JT, Schianchi PM: Cerebral artery spasm. A histological study at necropsy of the blood vessels in cases of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **48**: 515-525, 1978.
- 12) Kwak R, Niizuma H, et al: Angiographic study of cerebral vasospasm of following rupture of intracranial aneurysms: Part I. Time of appearance. *Surg Neurol* **11**: 257-262, 1979.
- 13) Maral J, Puget K, et al: Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem Biophys Res Commun* **77**: 1525-1535, 1977.
- 14) Maurer P, Moskowitz MA, et al: The synthesis of prostaglandins by bovine cerebral microvessels. *Prostaglandin Med* **4**: 153-161, 1980.
- 15) Misra HP, Fridovich I: The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* **247**: 6960-6962, 1972.
- 16) 宮岡 誠: 脳血管攣縮に関する実験的研究. 日外会誌 **78**: 345-358, 1977.
- 17) Moncada S, Gryglewski R, et al: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**: 663-665, 1976.
- 18) Okamoto S, Handa H, et al: Role of intrinsic prostaglandins in vascular actions of red blood cell hemolysate. *Blood Vessels* **18**: 222-223, 1981.
- 19) Osaka K: Experimental studies on cerebrovascular spasm in cats. *Arch Jap Chir* **38**: 349-371, 1969.
- 20) Osaka K, Handa H, et al: Subarachnoid erythrocytes and their contribution to cerebral vasospasm. *In Neurology of Cerebrospinal Fluid*, Vol. 1 edited by Wood JH, New York, Plenum, 1980, pp. 313-323.
- 21) 芦坂邦彦, 岡本新一郎, 他: 重症クモ膜下出血の治療——クモ膜下腔赤血球の重要性とその除去法について——日外宝 **48**: 197-204, 1979.
- 22) Ozaki N, Mullan S: Possible role of the erythrocyte in causing prolonged cerebral vasospasm. *J Neurosurg* **51**: 773-778, 1979.
- 23) Pickard JD, Vinall PE, et al: Prostaglandins and cerebral vasospasm: A problem of interpretation. *Surg Forum* **26**: 496-498, 1975.

- 24) Sasaki T, Tanishima T, et al: Significance of lipid peroxidation in the genesis of chronic vasospasm following rupture of an intracranial aneurysm. *Acta Neurochir (Suppl)* **28**: 536-540, 1979.
- 25) Tanabe Y, Sakata K, et al: Cerebral vasospasm and ultrastructural changes in cerebral arterial wall. An experimental study. *J Neurosurg* **49**: 229-238, 1978.
- 26) Tanishima T: Cerebral vasospasm: contractile activity of hemoglobin in isolated canine basilar arteries. *J Neurosurg* **53**: 787-793, 1980
- 27) Toda N, Miyazaki M: Responses of isolated dog cerebral and peripheral arteries to prostaglandins after application of aspirin and polyphloretin phosphate. *Stroke* **9**: 490-498, 1978.
- 28) Toda N, Shimizu K, et al: Mechanism of cerebral arterial contraction induced by blood constituents. *J Neurosurg* **53**: 312-322, 1980.
- 29) Vane JR: A sensitive method for assay of 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol* **12**: 344-349, 1957.
- 30) Whittle BJR, Mugridge KG, et al: Use of the rabbit transverse stomach-strip to identify and assay prostacyclin, PG A<sub>2</sub>, PG D<sub>2</sub> and other prostaglandins. *Eur J Pharmacol* **53**: 167-172, 1979.
- 31) Yamamoto YL, Feindel W, et al: Experimental vasoconstriction of cerebral arteries by prostaglandins. *J Neurosurg* **37**: 385-397, 1972.
- 32) Yoshimoto A, Ito H, et al: Cofactor requirements of the enzyme synthesizing prostaglandin in bovine seminal vesicles. *J Biochem* **68**: 487-499, 1970.